

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 04-187645

(43)Date of publication of application : 06.07.1992

(51)Int.Cl.

A61K 39/395

A61K 39/395

(21)Application number : 02-315792

(71)Applicant : KISHIMOTO CHUZO
CHUGAI PHARMACEUT CO LTD
TOSOH CORP

(22)Date of filing : 22.11.1990

(72)Inventor : KISHIMOTO CHUZO
SUZUKI HIROSHI
YASUKAWA KIYOSHI

(54) AGENT FOR SUPPRESSING ACTION OF INTERLEUKIN 6

(57)Abstract:

PURPOSE: To provide an agent for suppressing action of interleukin 6(IL-6) by using an anti-IL-6 receptor antibody as a component.

CONSTITUTION: The objective agent contains, as an active component, (A) a polyclonal antibody prepared by immunizing mouse, rabbit, etc., with an immunogen such as human IL-6 receptor manifestation cell exemplified by human myeloma cell U266, a human IL-6 receptor manifestation cell exemplified by MI or soluble human IL-6 receptor produced by genetic engineering means or (B) a monoclonal antibody produced by a hybridoma prepared by immunizing a mammal such as mouse or rat and fusing the spleen cell of the animal with a myeloma cell. The suppressing agent is effective for the treatment of diseases (e.g. myeloma, chronic rheumatism and Kaposi's sarcoma) caused by various actions such as thrombocyte-increasing, antibody production promoting, acute phase protein inducing and tumor cell proliferating actions induced by IL-6.

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平4-187645

⑤ Int. Cl.⁵

A 61 K 39/395

識別記号

A C B D
U

庁内整理番号

8829-4C
8829-4C

④ 公開 平成4年(1992)7月6日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全4頁)

⑤ 発明の名称 インターロイキン-6作用抑制剤

② 特 願 平2-315792

② 出 願 平2(1990)11月22日

特許法第30条第1項適用 平成2年10月31日、日本免疫学会発行の「日本免疫学会記録第20巻」に発表

⑦ 発 明 者	岸 本 忠 三	大阪府富田林市中野町3丁目5番31号
⑦ 発 明 者	鈴 木 浩	神奈川県海老名市柏ヶ谷967-1
⑦ 発 明 者	保 川 清	神奈川県相模原市相模大野7-37-17
⑦ 出 願 人	岸 本 忠 三	大阪府富田林市中野町3丁目5番31号
⑦ 出 願 人	中外製薬株式会社	東京都北区浮間5丁目5番1号
⑦ 出 願 人	東ソー株式会社	山口県新南陽市大字富田4560番地
⑦ 代 理 人	弁理士 青木 朗	外4名

明 細 書

1. 発明の名称

インターロイキン-6作用抑制剤

2. 特許請求の範囲

1. 抗インターロイキン-6(IL-6)レセプター抗体を含んで成るIL-6作用抑制剤。

2. IL-6による血小板増多作用を抑制する、請求項1に記載のIL-6作用抑制剤。

~~3. IL-6による抗体産生増強効果を抑制する、請求項1に記載のIL-6作用抑制剤。~~

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は抗IL-6レセプター抗体を含んで成る、生理活性物質であるIL-6の作用抑制剤に関するものである。

〔従来の技術〕

インターロイキン-6(IL-6)は、免疫、造血、炎症等の生体防御系において重要な役割を果たしており、生体の増殖分化に広く関与するタン

パク質であるが、一方IL-6の生体内での過剰産生は、自己免疫疾患の原因のひとつとして知られている(岸本、Blood, 74, p1, 1989年参照)。したがって生体内でIL-6の作用を人為的に抑制することは、自己免疫疾患の新しい治療のメカニズムとして期待されている。

しかしながら、IL-6の作用を人為的に確実に抑制する手段はまだ見出されていない。

〔発明が解決しようとする課題〕

従って本発明はIL-6の作用を抑制するための新規な手段を提供しようとするものである。

〔課題を解決するための手段〕

本発明者は前記の課題を解決すべく種々検討の結果、IL-6レセプターに対する抗体がIL-6の生物学的作用を抑制するという驚くべき知見を得、これに基づいて本発明を完成した。

従って本発明は、抗IL-6レセプターに対する抗体を含んで成る、IL-6作用抑制剤を提供

するものである。

〔具体的な説明〕

本発明において使用する抗IL-6レセプター抗体は、IL-6レセプターを特異的に認識するものであり、これにはモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体が含まれる。本発明における抗体の製造のために用いられるヒトIL-6レセプターを含む免疫原としては、ヒトミエローマ細胞U266で例示されるヒトIL-6レセプター発現細胞、M1で例示されるヒトIL-6レセプター発現細胞、遺伝子工学的に作製された可溶性ヒトIL-6レセプター（特願平1-9774参照）等が挙げられる。

ポリクローナル抗体の製造は、常法に従って、例えば上記いずれかの免疫原によりマウス、ウサギ、ラット、モルモット等を免疫感作することによって行うことができる。

モノクローナル抗体の製造のためのハイブリドーマの作製も常法に従って行うことができる。例

えば上記いずれかの免疫原によりマウスやラット等の哺乳類を免疫し、この動物から脾臓細胞を得、これを樹立されたミエローマ細胞と融合せしめる。次に、生体内でのIL-6作用に対する阻害性を有するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをクローニングする。生体内でのIL-6作用に対する阻害性の評価法としては、抗マウスIL-6レセプターモノクローナル抗体の場合は、本明細書の実施例で提供される方法、すなわちマウスに投与されたヒトIL-6の血小板増多作用に対する阻害性や、マウスに投与されたヒトIL-6の抗体産生増強効果に対する阻害性が挙げられる。また抗ヒトIL-6レセプターモノクローナル抗体の場合は、ヌードマウスに移植されたIL-6依存性ヒト癌細胞の増殖に対する阻害性が挙げられる。多数のクローンをスクリーニングする際は、まずインビトロでのIL-6作用に対する阻害性を評価して、一定数のクローンを選抜しても良い。

上記ポリクローナル抗体、及びモノクローナル

抗体の回収・精製方法は、いずれもそれ自体当業界によりよく知られている方法により行うことができる。

本発明中の抗体は、上記方法で調製された天然型の抗体だけでなく、さらに上記抗体を出発材料として、遺伝子工学的手法や蛋白化学的方法を用いて作製された人工型の抗体でもよい。前者の例としては、マウス由来抗ヒトIL-6レセプターモノクローナル抗体の可変領域（V領域）とヒト抗体の不変領域（C領域）を遺伝子工学的手法で結合させたキメラ型抗体を挙げることができる。このような抗体の作製方法は、それ自体当業界によりよく知られている方法により行うことができる。また後者の例としては、バビインで抗体分子を切断し調製されうるFab領域等が挙げられる。

なお、ヒトIL-6レセプターに対するモノクローナル抗体は特願平2-189420号明細書中に、PM1抗体、及びMT18抗体として記載されており、これらを本発明において使用することができる。また、マウスIL-6レセプターに対する抗

体は特願平2-215886号明細書に記載されたマウスIL-6レセプターを免疫原として、常法に従って調製したものを本発明において用いることができる。

IL-6は細胞膜上のIL-6レセプターと結合し、さらにgp130に会合し、シグナルが伝達される。この様なIL-6シグナル伝達経路の過程において、抗IL-6レセプター抗体は、生体内でのIL-6作用を抑制する効果を有する。本発明の抑制剤により抑制されるIL-6の作用としては、血小板増多作用、抗体産生増強作用、急性期蛋白誘導作用、腫瘍細胞増殖作用、神経細胞分化作用等が挙げられる。従って、これらの作用に起因する疾患、例えばミエローマ、慢性関節リウマチ、カポジ肉腫、キャッスルマン症候群等の治療において本発明の抑制剤は有効であると考えられる。

本発明の抑制剤は、好ましくは非経口投与により、例えば静脈内投与、筋肉内投与、経皮投与等により投与することができる。投与量は疾患の種

類、患者の状態等により異なるが、一般に $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲である。本発明の抗体は常用の賦形剤、例えば生理食塩水、ブドウ糖液、マンントール、メチルセルロース、ゼラチン等と混合することにより製剤化される。本剤はまた、凍結乾燥品であることができ、これは使用直前に生理食塩水、5%ブドウ糖液、リンゲル液等の等張液により再溶解することができる。またつけ加えるならば、ヒトに対しては、ヒトIL-6レセプターを免疫原としてマウス、ラット等を用いて調製した抗ヒトIL-6レセプター抗体をキメラ化した、ヒト人体において異物として認識され難いキメラ抗体を用いると良い。

(実施例)

以下本発明をさらに詳細に説明するために実施例を記載するが、本発明はこれら実施例により限定されるものではない。

に示す。

第2図から明らかなように、 $90\mu\text{g}/\text{日}$ のIL-6を投与した群では有意に血小板数が増加しているのに対し、 $900\mu\text{g}/\text{日}$ の抗体を投与した群（前記②、③の群）では、いずれもIL-6を投与したにもかかわらずIL-6未投与群（対照）と同じレベル又はそれ以外であった。このことから、抗マウスIL-6レセプター・ポリクローナル抗体は、*in vivo*でのIL-6の血小板増多効果に対する抑制効果を示すことが観察された。

実施例2、抗マウスIL-6レセプター・ポリクローナル抗体による、IL-6の抗体産生増強効果の抑制

BALB/Cマウス（雄性、5週齢）に、 1mg のDNP/BSA（シグマ社）を皮下投与し、翌日から1日1回 $0\sim 10\mu\text{g}$ のIL-6及び $0\sim 100\mu\text{g}$ の抗マウスIL-6レセプター・ポリクローナル抗体（実施例1参照）の混合液を腹腔内に6日間連続投与した。7日目に全採血を行い、血清分離をし、抗DNP/BSA抗体価を通常のELISA法で測定した。

実施例1、抗マウスIL-6レセプター・ポリクローナル抗体による、IL-6の血小板増多作用の抑制

抗マウスIL-6レセプター・ポリクローナル抗体は、CHO細胞由来可溶性マウスIL-6レセプター（特願平1-292230号、特願平2-215886号参照）をモルモットに免疫して調製した。ICRマウス（雄性、5週齢）1群5匹、全4群を用い、その内の一群を未投与群（対照）とし、他の3群をそれぞれ、① $90\mu\text{g}$ の大腸菌由来リコンビナントIL-6を1日1回腹腔打ちに投与する群、②1日1回、 $900\mu\text{g}$ の抗マウスIL-6レセプター・ポリクローナル抗体を腹腔内に投与した後、 $90\mu\text{g}$ の前記リコンビナントIL-6を投与する群、③ $900\mu\text{g}$ の抗マウスIL-6レセプター・ポリクローナル抗体と $90\mu\text{g}$ のリコンビナントIL-6を混合して1日1回投与する群とし、それぞれ5日間連続投与した。6日目に後大動脈より全採血し、血小板数をヘモサイトメーターPC-601（エルマ社製）で計数した。この結果を第1図

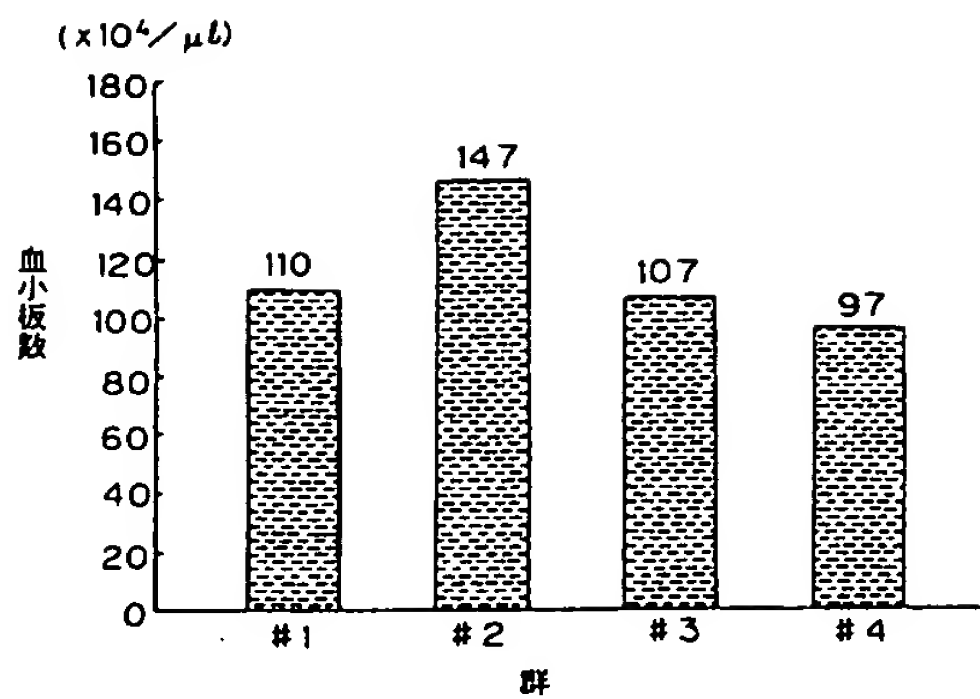
即ち各血清に対し10倍希釈を最高濃度とし、さらに2倍希釈列を作り、これらの抗DNP/BSAに特異的なIgG量を測定した。

第2図は横軸にその希釈倍数を、縦軸にIgG量に相関した405nmでの吸光度を示したもので、この図から明らかなように、 $10\mu\text{g}/\text{日}$ のIL-6投与により増加した抗DNP/BSA抗体価は、投与した抗体量に依存して下がり、特に $100\mu\text{g}/\text{日}$ の抗体投与では、IL-6未投与のレベル以下に下がった。このように、抗マウスIL-6レセプター・ポリクローナル抗体の、*in vivo*でのIL-6の抗体産生増強効果に対する抑制効果が観察された。

4. 図面の簡単な説明

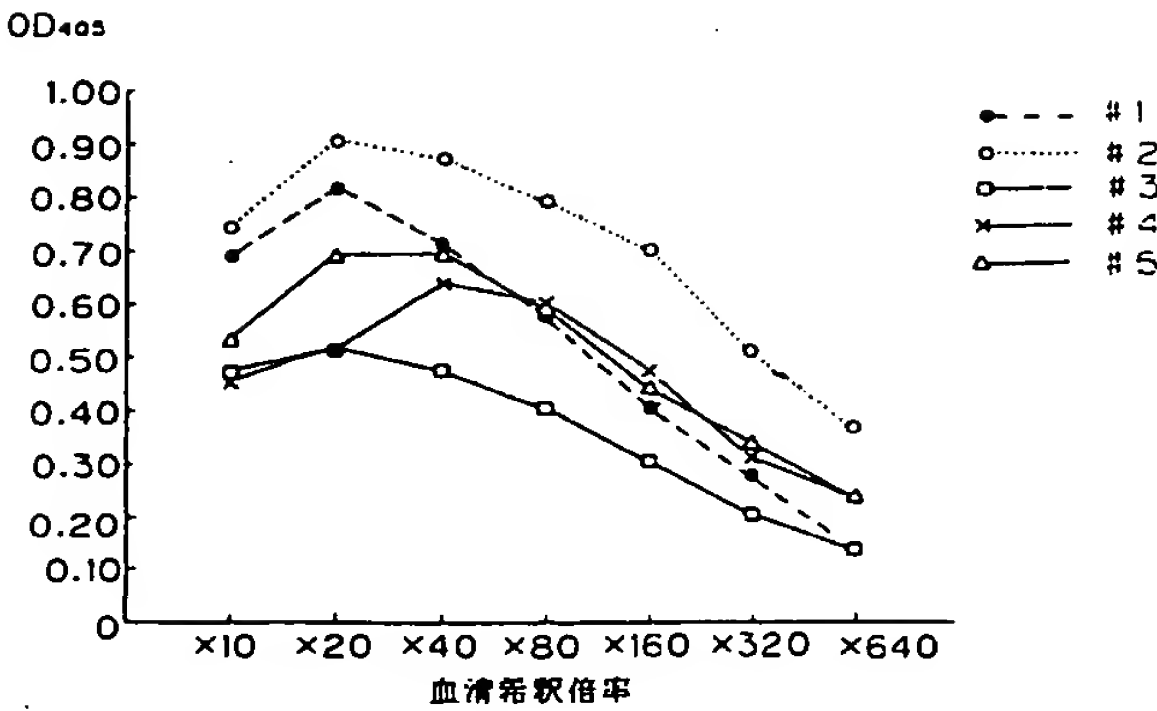
第1図は、IL-6及び抗マウスIL-6レセプター・ポリクローナル抗体を投与されたICRマウスの血小板数を示す。

第2図は、IL-6及び抗マウスIL-6レセプター・ポリクローナル抗体を投与されたDNP/BSA感作マウスの抗DNP/BSA抗体価を示す。



#1 : サンプル未投与群
#2 : IL-6 90 μg 腹腔投与群
#3 : 抗マウスIL-6レセプター・ポリクローナル抗体 900 μg 静脈投与
IL-6 90 μg 腹腔投与群
#4 : 抗マウスIL-6レセプター・ポリクローナル抗体 900 μg 腹腔投与
IL-6 90 μg 腹腔投与群

第 1 図



グループ #	DNP/BSA (mg)	IL-6 (μg/日)	抗マウスIL-6レセプター・ ポリクローナル抗体 (μg/日)
1	10	0	0
2	10	10	0
3	10	10	100
4	10	10	50
5	10	10	25

第 2 図